

PRODUCTION OF BLOOD PLASMA FREE FROM HEPATITIS B VIRUS

Reference(6)

Patent number: JP63088130
Publication date: 1988-04-19
Inventor: IWATA MICHITAKA; AIZAWA HIDE
Applicant: ASAHI CHEMICAL IND
Classification:
- international: A61K35/14
- european:
Application number: JP19860233256 19861002
Priority number(s): JP19860233256 19861002

[Report a data error here](#)

Abstract of JP63088130

PURPOSE: To obtain a blood plasma free from hepatitis B virus, by filtrating the blood plasma in a blood bag containing the hepatitis B virus obtained by a centrifuge method, through a module constituted by porous hollow fiber consisting of cellulose regenerated by the copper-ammonia process.

CONSTITUTION: Blood plasma in a blood bag containing hepatitis B virus obtained by centrifugal separation of the blood containing the virus is filtrated using a porous hollow fiber consisting of cellulose regenerated by the copper- ammonia process without directly bringing into contact with the outside air to provide the aimed plasma. As the above-mentioned porous hollow fiber, hollow fiber having conditions in which water flow rate average pore size of membrane D(nm) and membrane thickness T(mu m) satisfy the equation and the blocking factor of the hepatitis B virus phi satisfies $\phi >= 3$ is used. The blood plasma is separated from a blood cell and recovered and at the same time, the hepatitis B virus in the blood plasma can be removed by utilizing a pressure loaded on the blood bag. Blood after blood collection can be filtrated in a short time and in an extremely limited space.

$$T = \frac{0.62 \times 10^{-2} - 2.34 \times 10^{-2} \cdot D}{0.5 \times 1}$$

⑯ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭63-88130

⑮ Int.Cl.¹

A 61 K 35/14

識別記号

府内整理番号

8615-4C

⑭ 公開 昭和63年(1988)4月19日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑯ 発明の名称 B型肝炎ウイルスフリー血漿の製造方法

⑫ 特願 昭61-233256

⑫ 出願 昭61(1986)10月2日

⑯ 発明者 岩田道隆 大阪府高槻市八丁畷町11番7号 旭化成工業株式会社内

⑯ 発明者 相沢秀 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 旭化成工業株式会社内

⑫ 出願人 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

⑯ 代理人 弁理士 佐々木俊哲

明細書

1. 発明の名称

B型肝炎ウイルスフリー血漿の製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) B型肝炎ウイルスを含む血液を遠心分離して得られたB型肝炎ウイルスを含む血液バッグから、B型肝炎ウイルスフリー血漿を製造する方法において、B型肝炎ウイルスを含む血液バッグ中の血漿を鋼アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空纖維で構成されたモジュールで通過することを特徴とするB型肝炎ウイルスフリー血漿の製造方法。

(2) 鋼アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空纖維が、膜の水流速平均孔径D (nm)、膜厚T (μm) が下記(1)式を満足し、かつその阻止係数φが、 $\phi \geq 3$ を満足する条件のものである特許請求の範囲第1項記載のB型肝炎ウイルスフリー血漿の製造方法。

$$\phi \geq 0.5 \times 10^{(6.62 \times 10^{-2} - 2.34 \times 10^{-2} \cdot D)} \times T (1)$$

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、B型肝炎ウイルス(HBV)フリー血漿の製造方法に関し、血清肝炎のような輸血時の血漿を介してのB型肝炎ウイルス感染防止に利用できる。

本発明におけるB型肝炎ウイルスを含む血漿とは、抗原抗体反応を利用したB型肝炎ウイルス検査において陽性の血漿と、この検査において陰性であってもB型肝炎を感染させうる血漿の両方を意味する。

(従来技術)

B型肝炎は主として血液を介して感染するウイルス性疾患である。

B型肝炎ウイルスは1970年Daneらによつて、オーストラリア抗原(Au抗原、HBs抗原)陽性血内に確認されたものであつて、二重構造をした球形DNAウイルスである。

B型肝炎ウイルスに感染したヒトの血清を遠心

力を利用して沈澱させた液を電子顕微鏡下で観察すると、直径42nmの大型球形粒子(Dane粒子)、直径22nmの小型球形粒子および管状粒子が見いだされる。本発明でいうB型肝炎ウイルスとは、これらの粒子のすべて、あるいはいずれかを指す。

Dane粒子は、中心に直径27nmの内部粒子(Core粒子)を有し、また表面には外殻がある。Core粒子内には、分子量 $1 \cdot 6 \times 10^6$ の2本鎖DNAとDNAポリメラーゼが含まれている。

Dane粒子の外殻は、HBs抗原(HBsAg)活性を有し、これとは別にCore粒子表面にはHBC抗原(HBcAg)活性がある。また、Core粒子には分子量19,000(P19)の単位核蛋白が存在するが、P19の一部はCore粒子の表面に露出し、そのN末端側の部分はHBc抗原(HBcAg)活性を持つ。HBcAgは血中に出現することがある。

B型肝炎は、HBVキャリアーの血液が輸注さ

本発明の目的は、遠心分離法で得られた血液バッグ内の血漿から血漿蛋白を変性させることなく、直接B型肝炎ウイルスフリー血漿を採血後短時間内に製造する方法を提供することである。

(問題点を解決するための手段)

本発明は、遠心分離して得られたB型肝炎ウイルスを含む血液バッグ中の血漿を銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空繊維で構成されたモジュール(成型物)で通過することを特徴とするB型肝炎ウイルスフリー血漿の製法である。

再生セルロースには、ビスコース法、セルロースエステルのケン化法、銅アンモニア法など、種々のものがあるが、各々、製造条件の相違により物理的、化学的な性質において決して「再生セルロース」として一律に論じられるものではない。

銅アンモニア法では、不可欠な酸処理により銅の除去に伴う微細な孔の発生と特異な分子鎖の凝集構造の発生が認められるため、銅アンモニア法再

れることにより、受血者に高率に発生するほか、注射針やカミソリの刃についた微量の血液によって感染することがありうる。

そのため現在は、血漿や血漿製剤などは、加熱処理でB型肝炎ウイルスを不活性化させている。

(発明が解決しようとする問題点)

B型肝炎ウイルスの感染防止のため、60°C×10hr程度の加熱処理が一般的に用いられている。しかし、加熱処理に耐える血漿蛋白は、極めて限られており、特に生理活性を有する血漿蛋白は熱に対して非常に敏感で、加熱処理による熱変性を起こしやすく、活性が低下、消失しやすい。また時にはB型肝炎ウイルスを含んだ血漿を直接輸血に使用してしまうことがあり、その場合重症肝炎などのウイルス性疾患を引き起こす。また、採血現場で遠心分離法で得られた血漿から、直ちにB型肝炎ウイルスを除去する必要性が治療場面では存在する。加熱処理では、この要求を満足することは難しい。

生セルロースは特異な性質を持つ。

その性質の特徴は、親水性で、かつ蛋白質の吸着性が少ない点にある。本発明者は、蛋白質と高分子素材との吸着性に関する相関性を検討した結果、一般的には、親水性素材ほど、蛋白質の吸着性が小さく、本発明方法に用いられる銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空繊維が既存の中空繊維の中で一番少ないと想されることを見いだした。

銅アンモニア法再生セルロースの粘度平均分子量は 7×10^4 以上が好ましく、また0.1N NaOH水溶液中での溶解成分が少なければ少ないほど望ましい。40°C、48時間、0.1N NaOH水溶液中に投漬した際、この溶解分が10ppm以下であれば、この中空繊維は血漿中よりB型肝炎ウイルスを除去するのに最も適している。

上述のようなセルロースからなる中空繊維を作製するには、高純度セルロース原料を用いて銅アンモニア法再生セルロースを作製するか、あるいは

は中空纖維を作製後に0.1N NaOH水溶液で72時間以上洗浄処理すれば良い。高純度セルロース原料を用いれば、上記溶解分が著しく減少するので、より好ましい。ここで、「高純度セルロース原料」とは、α-セルロース含量率が95wt%以上で、重合度が500以上の木綿リソナーおよび木材バルブを指す。これらの原料について、ブリーチング、洗浄工程中の分解および酸化を防止しつつ、不純物の混入を避けるために、常に精製された水を用いると良い。

銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空纖維の特徴は、内壁面から外壁面への膜厚方向に垂直な面における孔径を面内平均孔径で表す時、前記膜内貫通孔の入口から出口にかけての面内平均孔径が、極小の部分、該極小の部分より大きい部分、極小の部分の順に配列された構造が、中空纖維の膜厚方向に存在する点にある。したがって、従来の多孔質中空纖維にくらべて、銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空纖維のB型肝炎ウイルスの阻止率を高くすることが

が実験的に成立することを見いだした。即ち、阻止係数 ϕ と下記(3)式の関係にあるウイルス阻止率R(%)の達成されるべき目標値を設定すれば、(1)式により使用すべき膜の平均孔径D(nm)と膜厚T(μm)の任意の組み合わせを得ることが可能である。

$$R(\%) = (1 - e^{-\phi}) \times 100 \quad (3)$$

ウイルス粒子の除去を目的とする場合、阻止率Rは限りなく100%に近いことが望ましいが、例えば、病原性ウイルスの血液中濃度、滤液中濃度と発病するウイルス濃度いき値との関係から、ウイルス阻止係数 ϕ は3以上、望ましくは5以上である。したがって、下記(4)式の条件を満足する平均孔径D(nm)、膜厚T(μm)の膜を用いることが必要である。

$$0.5 \times 10^{(6.62 \times 10^{-2} - 2.34 \times 10^{-2} D)} \times T \geq 3 \quad (4)$$

膜によるウイルス粒子の除去機構として、膜の孔径の大きさと除去すべきウイルス粒子の粒子径との違いによりふるい分ける「ふるい機構」と、膜表面にウイルス粒子を吸着させる「吸着機構」

できると共に、透過速度を高くすることができる。これに対して、面内平均孔径の極小部が2つ以上存在しない従来の多孔性中空纖維の場合では、阻止率を99.99%以上にするためには、透過速度を小さくせざるを得ない。また、B型肝炎ウイルスの除去法に際して達成すべきB型肝炎ウイルス粒子阻止係数 ϕ が、膜の水流速平均孔径D(nm)、膜厚T(μm)により下記(1)式のように、一義的に定まる点にある。

$$\phi = 0.5 \times 10^{(6.62 \times 10^{-2} - 2.34 \times 10^{-2} D)} \times T \quad (1)$$

ここで、ウイルス粒子阻止係数 ϕ とは、透過しようとする水溶液単位体積当たりのB型肝炎ウイルスの数N₀、膜を透過した滤液単位体積当たりのB型肝炎ウイルスの数Nのとき下記(2)式で定義される。

$$\phi = -\log(N/N_0) \quad (2)$$

本発明者は、銅アンモニア法再生セルロースからなる中空纖維を様々な製造条件により作製し、平均孔径D(nm)、膜厚T(μm)との関係の阻止係数 ϕ を検討した結果、(1)式での関

がある。銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空纖維では、蛋白質の吸着性が他の多くの高分子素材にくらべて、最も小さいという本発明者らの検討結果を考慮すれば、(4)式が成立することは、銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空纖維によるウイルス粒子除去は、殆ど「ふるい機構」であると考えられる。これが銅アンモニア法再生セルロース中空纖維の最大の特徴である。

銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空纖維のその他の特徴として、極小面内空孔率は10%以上である点である。10%未満では、限外透過速度は急激に低下する。好ましくは30%以上である。限外透過速度に及ぼす面内空孔率の影響は、10%未満では極小面内空孔率の5乗、10~30%では約2乗、30%を越えると約1乗に比例して限外透過速度は増加する。一方、極小面内空孔率が8.0%を越えると、多孔性中空纖維の力学的性質は著しく低下し、ピンホール等の欠陥部が生じたり、中空纖維を構成するセ

セルロース分子が、滲液中あるいは被滲過液中に脱落分散する恐れがある。

再生セルロースは親水性に優れているため、水溶液中で一般には膨潤する。膨潤によってセルロース中空繊維が変形し、そのため中空繊維表面（内壁面）上での目詰まりが起こることがある。これを防ぐには、中空繊維を構成するセルロース分子鎖の面内配向度が60%以上であることが好ましい。また面内配向度が大きくなりすぎると膜厚方向での膨潤時の変形および膜面内での収縮がこるため、面内配向度が80%以下であることが好ましい。

中空繊維の膜厚は薄ければ薄いほど、一般には滲過速度が大きくなるので好ましい。しかしながら、膜厚が10μm未満になると、中空繊維にはピンホールが多発し、ウイルス粒子が滲液中に漏れ出てくる。また膜厚が100μm以上になると、滲過速度が大きく低下し、被滲過流体中の蛋白質の吸着量が増大する。極小面内空孔率が大きくなれば膜厚をより厚く設計するのが良い。

中に8wt%の濃度で溶解したものを紡糸原液として用いる。この紡糸原液に対して、アセトン／アンモニア／水系混合溶液を凝固剤および中空剤として用いてミクロ相分離を生起させ、その後、凝固、再生することにより得られる。ここで、ミクロ相分離とは、溶液中に高分子の濃厚層あるいは希薄層が直径0.02~数μmの粒子として分散し、安定化している状態を意味する。ミクロ相分離の生起は、紡糸中の糸の失透現象によって直接肉眼観察するか、あるいは紡糸後の糸の電子顕微鏡観察により、直径1μm以下、0.02μm以上の粒子の存在で確認される。

本発明の特徴は、遠心分離して得られた血液バッグ中の血漿から直接外気と接することなく直接該血漿を多孔性中空繊維を用いて滲過する点にある。血液バッグに負荷する圧力をを利用して血球と血漿とを分離回収すると同時に、血漿中のB型肝炎ウイルスを除去出来る。採血後の血液を短時間で、かつ非常に限られた空間内での滲過が可能となり、血漿蛋白の変性を伴わないウイルスフ

本発明方法に用いられる銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空繊維は、該中空繊維の内壁面から外壁面への膜厚方向に階状構造を有し、かつ蛋白質の透過性、B型肝炎ウイルスの阻止性を支配する極小部を有している。その極小部分の膜厚方向での厚みは、該多孔性中空繊維が、ミクロ相分離法で作製されるため、セルロース濃厚相粒子の直徑に相当する。したがって、その厚みは2μm以下である。

本発明の実施態様は、例えば添付図面に示すように、遠沈された血液バッグ(2)を分離スタンド(3)に固定し、分離スタンドノブ(6)で圧力をかけながら、モジュール(1)でB型肝炎ウイルスを含む血漿(4)を直接分離(垂直滲過)し、B型肝炎ウイルスフリー血漿(5)を得る。

本発明方法で用いられる銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空繊維の製造方法としては、例えば、セルローススリンター(α-セルロース含有量96%以上、平均分子量 2.6×10^5)を公知の方法で調整した銅アンモニア溶液

リーアンモニア溶液が簡単に血漿バッグ詰め出来る。

本発明方法による実施例を説明するに先立ち、本明細書中に用いられている主な技術用語(物性値)の定義とその測定方法を以下に示す。

[水流速平均孔径]

銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空繊維のモジュールを作製し、そのモジュール状態で、中空繊維の水の流出量を測定し、(5)式から水流速平均孔径(D)を求めた。

$$D(\text{mm}) = 2.0 \times \sqrt{\frac{V \cdot T \cdot \mu}{\Delta P \cdot A \cdot F_{rp}}} \quad (5)$$

V：流出量 (ml/min)

T：膜厚 (μm)

△P：圧力差 (mmHg)

A：膜面積 (m²)

F_{rp}：空孔率 (-)

μ：水の粘性率 (cP)

空孔率F_{rp}は水膨潤時の見掛け密度ρ_{av}、ポリマーの密度ρ_pより(6)式で求めた。セルロースの場合ρ_p=1.561を用いた。

$$Pr_p (\%) = (1 - \rho_{aw} / \rho_p) \times 100 \quad (6)$$

[平均分子量]

銅アンモニア溶液中(20°C)で測定された極限粘度数[η](ml/g)を(7)式に代入することにより平均分子量(粘度平均分子量)Mvを算出する。

$$Mv = [\eta] \times 3.2 \times 10^3 \quad (7)$$

[極小面内空孔率]

銅アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空繊維をアクリル樹脂で包埋後、ウルトラミクロトーム(LKB社(スウェーデン)製Ultraatom III 8800型)に装着したガラスナイフをもちいて、外壁面から膜厚方向に沿って厚さ約1μmの試料を順に切り出す。その試料切片をクロロホルムで脱包埋後、それぞれの切片の電子頭微鏡写真をとる。注目する切辺の1cm当たり、孔半径が(r)~(r+dr)に存在する孔の数をN(r)drと表示する。3次および4次の平均孔半径(それぞれ \bar{r}_3 および \bar{r}_4)は次式で定義される。

以下本発明によるB型肝炎ウイルスフリー血漿の製造方法の実施例を示す。

(実施例1)

セルロースリントー(α-セルロース含有量96%以上、平均分子量 2.6×10^5)を公知の方法で調整した銅アンモニア溶液中に8wt%の濃度で溶解し、過脱泡を行い、紡糸原液とした。その紡糸原液を環状紡糸口の外側紡出口(外径2mmφ)より 2.6 ml/min で、一方中空剤として、アセトン45wt%／アンモニア0.575wt%／水54.425wt%の混合溶液(中空剤)を中心紡出口(外径0.6mmφ)より 1.4 ml/min でそれぞれアセトン45wt%／アンモニア0.575wt%／水54.425wt%の混合溶液(凝固剤)中に直接吐出し、 1.0 ml/min の速度で巻き取った。なお、吐出直後の透明青色状の繊維状物は次第に白色化し、ミクロ相分離を生起し、ひきつづいて凝固が起こり、繊維としての形状が維持されていた。その後、2wt%の硫酸水溶液で再生し、そ

$$\bar{r}_3 = \frac{\int_0^\infty r^3 N(r) dr}{\int_0^\infty r^2 N(r) dr} \quad (8)$$

$$\bar{r}_4 = \frac{\int_0^\infty r^4 N(r) dr}{\int_0^\infty r^3 N(r) dr} \quad (9)$$

平均孔径は $2\sqrt{\bar{r}_3 \bar{r}_4}$ で(8)式および(9)式から計算される。それぞれの切辺の電子頭微鏡写真より平均孔径を(9)式から計算し、面内平均孔径の内壁面からの距離に対する図示より、極小面内孔径を示す面を決定する。その決定された面の空孔率を極小面内空孔率と定義する。その極小面内空孔率は(10)式で求められる。

$$Pr(\%) = \pi \int_0^\infty r^2 N(r) dr \times 100 \quad (10)$$

(発明の効果)

本発明により、遠心分離法で得られた血液バッグから血漿蛋白を変性することなく、直接B型肝炎ウイルスフリー血漿を製造することが出来、血清肝炎のような輸血時の血液の血漿を介してのウイルス感染防止に利用できる。

(実施例)

の後、水洗した。湿润状態にある多孔性中空繊維をアセトンで、中空繊維内部の水を置換し、その後10%延伸した状態で真空乾燥した(25°C, 1.5h)。このようにして得られた銅アンモニア法再生セルロース多孔性中空繊維の内径は240.0μm、膜厚は30.0μm、水流速平均孔径は15.4nm、極小面内空孔率は21%であった。この中空繊維500本を束ねモジュールに成型した。

遠心分離された、B型肝炎ウイルスを含む血漿(A)と血球成分(B)を充填した血液バッグ(2)を第1図に示すような分離スタンダード(3)に固定し、該スタンダードのノブ(6)を押すにより圧力をかけながら上澄みの血漿のみを上記モジュール(1)で通過した。遠心の蛋白質濃度を分析した結果、アルブミンの透過率100%、γ-グロブリンの透過率80%であった。遠心分離後の血漿10mlを電子頭微鏡で観察した結果、B型肝炎ウイルスのHBs抗原およびDane粒子の数は、それぞれ 1.2×10^9 個/ml、

1.5×10^6 個/ ml であったが、滤液 $10\ \mu\text{l}$ 中にはそれぞれ 0 個であった。したがって $10\ \mu\text{l}$ 中には 0 個以下である。

故に、阻止係数 α は 7 および 4 以上であった。

(実施例 2)

実施例 1 で得られた鋼アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空繊維の蛋白質の吸着性を測定した。比較として、市販のセルロースアセテート(CDA) 中空繊維、ポリアクリロニトリル(PAN) 中空繊維、ポリエチレン(PE) 中空繊維の結果も合わせて第1表に示す。上記試料 $0.1\ \text{g}$ を $500\ \text{ppm}$ のフィブリノーゲン生理食塩水溶液 $20\ \text{ml}$ に浸漬した($37^\circ\text{C} \times 3$ 時間)。そして、浸漬前後のフィブリノーゲン溶液の濃度を分光光度計($280\ \text{nm}$)で定量した。中空繊維の単位重量当たりの面積を表面積測定装置(BET 法)で測定し、フィブリノーゲンの吸着量を算出した。

第1表より、親水性に優れた鋼アンモニア法再

生セルロース多孔性中空繊維のフィブリノーゲンの吸着量は、CDA、PAN、PE に比べて少ないことがわかる。したがって、鋼アンモニア法再生セルロースからなる多孔性中空繊維は、血漿透過において、蛋白質の透過性は大きい(実施例 1)。CDA、PAN、PE は蛋白質の吸着性が大きいため、蛋白質の透過性および透過速度は絶対的に低下する。

第1表

	吸着量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
本発明中空繊維	10
CDA 中空繊維	120
PAN 中空繊維	135
PE 中空繊維	50

4. 図面の簡単な説明

図は、本発明の1実施態様を示す説明図である。

1 中空繊維モジュール

2 遠心分離されたB型肝炎を含む血液バッグ

A 血漿

B 血球

3 分離スタンド

4 血漿バッグ

5 B型肝炎ウイルスフリー血漿

6 分離スタンドノブ

代理人弁理士 佐々木 俊哲

